

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 9 月 27 日 (27.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/70021 A1

- (51) 国際特許分類: A01N 1/02, A61F 2/06, 2/10, 2/14, A61L 27/38, 27/60 (YAMAMOTO, Naoka) [JP/JP]. 野村昌代 (NOMURA, Masayo) [JP/JP]. 森山 剛 (MORIYAMA, Takeshi) [JP/JP]; 〒487-0032 愛知県春日井市高森台五丁目1番地10 株式会社 メニコン 総合研究所内 Aichi (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/01619
- (22) 国際出願日: 2001 年 3 月 2 日 (02.03.2001) (74) 代理人: 朝日奈宗太, 外 (ASAHINA, Sohta et al.); 〒540-0012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目2番22号 NSビル Osaka (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, KR, SG, US.
- (30) 優先権データ: 特願2000-85235 2000 年 3 月 24 日 (24.03.2000) JP (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 メニコン (MENICON CO., LTD.) [JP/JP]; 〒460-0006 愛知県名古屋市中区葵三丁目21番19号 Aichi (JP). 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山本直香 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF PRESERVING TISSUE EQUIVALENT AND TISSUE EQUIVALENT PRESERVED IN FROZEN STATE

(54) 発明の名称: 組織等価物の凍結保存方法および凍結保存された組織等価物

(57) Abstract: A method of preserving a tissue equivalent in a frozen state whereby the survival ratio of frozen cells and the biological activity of thawed cells are elevated and the steps are simplified; and a tissue equivalent preserved in a frozen state which is obtained by this method. Cells suspended in a liquid for frozen preservation are inoculated into a substrate and then frozen before the cells adhere to the substrate.

(57) 要約:

凍結細胞の生存率および融解細胞の生物活性が向上され、かつ工程が簡略化された組織等価物の凍結保存方法を提供する。さらに、該方法により得られる凍結保存された組織等価物を提供する。

凍結保存液に懸濁した細胞を基材に播種し細胞が基材に接着する前に凍結する。

WO 01/70021 A1

明 細 書

組織等価物の凍結保存方法および 凍結保存された組織等価物

技術分野

本発明は、組織等価物の凍結保存方法および凍結保存された組織等価物に関する。さらに詳細には、細胞を凍結保存液中に懸濁する工程、基材上に該細胞を播種する工程、およびかくして得られた組織等価物を細胞が基材に接着する前に凍結させる工程からなる組織等価物の凍結保存方法および該方法により得られる凍結保存された組織等価物に関する。

背景技術

従来一般的な組織等価物の保存方法としては、細胞を培地に懸濁し、基材に播種し、培養して基材に接着させ、一定時間凍結保存液に浸漬して平衡化した後、徐冷し、凍結する方法が採られている。

しかし、従来方法は、細胞の生存率が非常に悪い上、一定の温度降下を調節するために精密かつ高価なプログラムフリーザー等の凍結装置を必要とするという問題点があった。また、基材に接着させるために細胞を前培養する工程（数時間から一晚）や凍結前に細胞を凍結保存液で洗浄する工程を要し、さらに凍結保存液の細胞内への浸透や平衡化に時間を要するという問題点も抱えている。

とくに人工皮膚においては、シート状の上皮細胞を凍

結状態で保存するための方法が特許公報第2722134号に、また、ゾルーゲル法を利用して培養皮膚を固定化し保存・輸送する方法が特開平第8-23968号公報にそれぞれ開示されている。

さらに、特表平第9-505032号公報には、組織等価物を凍結保護剤溶液に浸漬し、攪拌することによって凍結保護剤溶液を組織等価物中に十分に浸透させたのちに凍結する組織等価物の凍結保存方法が記載されている。この方法は、組織等価物が比較的厚く不均一な場合においても構造保全を損なうことなく細胞生活力を保持したまま組織等価物を凍結保存することを可能にしたが、凍結保護剤溶液の浸透に時間を要するという点で凍結保存工程の簡略化を十分に満たすものではない。

また、植物細胞の凍結保存方法および解冻方法が特開平第9-87102号公報に、人工肝臓の凍結保存方法が特開昭53-56897号、特開平2-71755号および特表平11-506687号公報に、角膜組織等価物の凍結保存方法が米国特許5374515号にそれぞれ記載されている。しかしながら、これらの方法は、凍結細胞の高い生存率、融解後の高い生物活性（たとえば細胞の増殖活性（率）、物質生産能など）および凍結保存工程の簡略化を十分に満たすものではない。

したがって、本発明は、凍結細胞の生存率および融解細胞の生物活性が向上され、かつ工程が簡略化された組織等価物の凍結保存方法を提供することを目的とする。さらに本発明は、該方法により得られる凍結保存された組織等価物を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、凍結保存液中に懸濁された細胞を基材に播種し、細胞が基材に接着する前に凍結することにより、細胞の生存率および生物活性を高く維持したまま組織等価物を保存できることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、細胞を凍結保存液中に懸濁する工程、基材上に該細胞を播種する工程、およびかくして得られた組織等価物を細胞が基材に接着する前に凍結させる工程からなる組織等価物の凍結保存方法、細胞が哺乳動物由来の線維芽細胞、表皮細胞、血管内皮細胞、ランゲルハンス細胞、メラノサイト、脂肪細胞、毛母細胞、毛乳頭細胞、平滑筋細胞、肝細胞、角膜実質細胞、角膜上皮細胞および角膜内皮細胞からなる群より1つ以上選択される前記凍結保存方法、および細胞を凍結保存液中に懸濁する工程、基材上に該細胞を播種する工程、およびかくして得られた組織等価物を細胞が基材に接着する前に凍結させる工程からなる方法により得られる凍結保存された組織等価物に関する。

発明を実施するための最良の形態

本発明で使用される「細胞」は、最終的に人工皮膚、人工肝臓、人工角膜として利用するためのものである。具体的には、人工皮膚の場合、哺乳動物由来の線維芽細胞、表皮細胞、ランゲルハンス細胞、メラノサイト、脂

肪細胞、毛母細胞および毛乳頭細胞からなる群より1つ以上選択されるものが好ましく、人工血管の場合、血管内皮細胞、平滑筋細胞および線維芽細胞からなる群から1つ以上選択されるものが好ましく、人工肝臓の場合は肝細胞が好ましく、人工角膜の場合、角膜実質細胞、角膜上皮細胞および角膜内皮細胞からなる群から1つ以上選択されるものが好ましい。

本発明における「懸濁」とは、溶液中にある細胞を分散させる操作を意味する。

また、本発明における「播種」とは、培地などに懸濁した細胞を培養容器の培地中あるいは基材に植え込むことを意味する。

さらに、本発明における「凍結」とは、基材上に細胞を播種して作られた組織等価物を培養せずに直ちに凍結させ、保存する工程を意味する。前培養して細胞が基材に接着したのちに凍結させると細胞の生存率が非常に低くなるため、細胞の播種後、細胞が基材に接着する前に細胞を凍結させるのが好ましい。このとき、細胞が基材に接着していなくとも融解後の洗浄による細胞の損失は殆どない。ここで、接着とは物理的な力を加えたときに細胞が基材から容易に遊離しない状態をいう。さらに、細胞の播種後、細胞が基材から容易に遊離しうる時間内に細胞を凍結させるのがより好ましい。ここで、遊離とは細胞が基材から容易に離れて溶液中に浮遊し得る状態をいう。したがって、具体的には、4～10℃までは細胞が基材に接着しないような速度で冷却しなければならない。冷却速度が低い場合には細胞が基材に接着してしまい、この状態で組織等価物を凍結すると細胞の生存率が

低下する。このときの冷却速度は使用する細胞および凍結保存液の種類、冷却を始めるときの組織等価物の温度などによって変化する。たとえば、厚さ 2 ～ 3 mm のコラーゲンスポンジに線維芽細胞を播種した人工皮膚の場合、4℃～常温で細胞を播種した場合には 3 時間以内に 4℃まで冷却するのが好ましい。

本発明における凍結方法は、とくに制限はないが、徐冷凍結法、急速凍結法およびガラス化凍結法などが好ましい。

ここで、「徐冷凍結法」とは、凍結保護剤を添加した溶液を用い、人工的に細胞外で形成させた氷晶を緩慢かつ適当な冷却速度で冷却することにより徐々に成長させ、緩やかな速度で細胞内を脱水、濃縮し、その後の急激な冷却により細胞内凍結を防止することによって保存、融解後の高い生存性が得られる方法である（日本胚移植学雑誌第 18 巻 1 号、「体外受精由来ウシ胚のガラス化保存」、家畜改良事業団・家畜バイオテクセンター）。冷却速度は 4℃までは前述のように細胞が基材に接着しないような速度で冷却し、それ以降は、少なくとも -20℃あるいはそれ以下の温度に達するまで -0.1℃/分～-10℃/分が好ましく、-0.2～-5℃/分がより好ましい。

「急速凍結法」とは、凍結保護剤を添加した溶液を用い、超低温冷凍庫などで急速に組織等価物（あるいは細胞）を氷点以下に冷却凍結させる方法である。冷却速度は 4℃までは前述のように細胞が基材に接着しないような温度で冷却し、それ以降については -10℃/分～-30℃/分が好ましく、-10℃/分～-20℃/分がより好ましい。-30℃/分より速いと細胞内凍結がおこり細胞が破

碎するおそれがある。

「ガラス化凍結法」とは、高濃度の凍結保護剤を添加した溶液（ガラス化溶液と言い、通常は細胞浸透性のものと細胞非浸透性のものを併用）に細胞を浮遊させた後に、液体窒素に投入するなどして急速に冷却して凍結する方法である。これは、高濃度の水溶液が高速で冷却される場合に、氷晶核の存在しないガラス化(vitrification)の状態になる現象を応用している（生殖細胞の培養法、学術出版センター、1993年；研究ジャーナル21(9)、志水学著、1998年）。本方法では組織等価物は数秒で凍結する。

本発明の方法における組織等価物の保存温度は、長時間生物活性を高く維持するために前記3つの凍結方法のいずれにおいても -20°C ～ -196°C が好ましく、 -80°C ～ -196°C がより好ましい。 -20°C より高い場合は長期保存（数ヵ月以上）すると細胞の生存率が低下する。したがって、短期間保存する場合には -20°C で充分であるが、長期保存する場合にはより低温で保存することが必要となる。 -80°C では1～2年の保存が可能であり、 -120°C 以下（窒素蒸気）または -196°C （液体窒素）では半永久的に保存できる。

本発明で使用される「凍結保存液」とは、凍結による細胞の傷害を防ぐ効果を有する凍結保護剤を少なくとも1種類含む溶液を意味する。

徐冷凍結法および急速凍結法の場合、凍結保護剤としてはグリセロール、ジメチルスルフォキシド(DMSO)、プロピレングリコール、エチレングリコール、蔗糖、カルボキシメチルセルロース塩、カルボキシメチルセルロ

ース(CMC)、単糖類および2糖類(トレハロース等)からなる群から少なくとも1種類が選択されることが好ましい。溶媒には水系液が使用される。とくに生理的塩類溶液が好ましい。生理的塩類溶液とは、細胞の生存に適したpHと浸透圧を備えた塩類溶液を意味し、生理的食塩水(0.9%水溶液)、生理的食塩水に K^+ 、 Ca^{2+} 等の数種類の主要なイオンを補足した塩類溶液または各種細胞培養液などが挙げられる。具体的には、DMEM(ダルベッコ変法イーグル最小必須培地)、リン酸緩衝液、リンガー液、リンガー-ロック液、タイロード液、アール液、ハンクス液、ロック液、イーグルの最小必須培養液、ハム(Ham)の合成培養液F12、グリーン培養液、レイボビッツ(Leibovitz)のL-15培養液、チーズ必須培養液、修飾イーグル培養液、ウェイマス(Waymouth)培養液、クレブス(Kreb's)培養液、ならびに無血清培養液MCDB153、MCDB151、MCDB104、MCDB131、MCDB402、MCDB201、MCDB302、MCDB105およびMCDB110などが挙げられる。

ガラス化凍結法の場合、凍結保護剤として、非細胞浸透性ガラス化剤および/または細胞浸透性ガラス化剤が用いられる。非細胞浸透性ガラス化剤としてはポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、フィコール(Ficoll)(アマシャム、ファルマシア・バイオテック社製)およびデキストランなどの多糖類ならびにショ糖などが好ましく、細胞浸透性ガラス化剤としてはグリセロール、プロピレングリコール、エチレングリコールおよびDMSOなどが好ましい。また、溶媒としては、徐冷凍結法および急速凍結法の場合と同様に、生理的塩類溶液が好ま

しい。具体的には、DMEM、リン酸緩衝液、リンガー液、リンガーロック液、タイロード液、アール液、ハンクス液、ロック液、イーグルの最小必須培養液、ハムの合成培養液F12、グリーン培養液、レイボビットのL-15培養液、チーズ必須培養液、修飾イーグル培養液、ウェイマス培養液、クレブス培養液、ならびに無血清培養液MCDB153、MCDB151、MCDB104、MCDB131、MCDB402、MCDB201、MCDB302、MCDB105およびMCDB110などが挙げられる。

本発明で使用する「基材」は、組織等価物を患者に適用（貼付）した場合に患者の免疫機能によって拒絶されることがないように、生体適合性に優れた材質でなければならない。また、後に取り除く必要性もないため生分解性の材質であることが好ましい。具体的には、生体由来材料であるコラーゲン、ゼラチン、キチン、キトサン、フィブリン、ならびに、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸およびヒアルロン酸などのムコ多糖類；生分解性の高分子であるポリグリコール酸、ポリ乳酸およびこれらの混合物；非生分解性の合成高分子のうちポリウレタン、ポリスチレン、ポリアクリレートなどの細胞接着性のよいもの；ならびにこれらの混合物からなるものが好ましい。さらに生体適合性に優れ、細胞が基材内に留まりやすいように、多孔質でスポンジ状の形態をもつアテロコラーゲン、コラーゲン、ゼラチン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸がより好ましい。細胞を播種する際に細胞がスポンジ内に浸透しやすいように、孔は細胞の播種面に対して垂直な縦型空孔で、表面および／または表面に対向する面に一定の大きさの空孔が形成され

ていることが望ましい。孔径は、播種時に細胞が浸透しやすく、かつ気泡が入りにくくするため、通常 $20\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$ の範囲が好ましい。ただし、本発明の目的を達成しうるかぎり必ずしもこれらの数値範囲に限定されるものではない。

本発明の「組織等価物」とは、基材と哺乳動物由来の細胞を組み合わせて作製された、哺乳動物組織の少なくとも一部と同等の機能を保持した構成物を意味する。したがって、本発明の組織等価物は、基材と該組織の代表的な細胞とを含んでなるものである。この代表的な細胞は該基材上または内部で該組織の細胞と同等の活性を有するので、該組織等価物は、(1)組織の損傷、切除などにより組織あるいは臓器が機能不全となった患者の該組織あるいは臓器を、完全または部分的に置換するため、種々の方法により移植または埋め込む目的で、あるいは(2)さまざまな製品・原材料と組織との相互作用、あるいはこれらが組織に与える影響を調べる目的で利用できる。

本発明の「人工皮膚」とは、基材と哺乳類の皮膚由来の細胞（線維芽細胞、表皮細胞、血管内皮細胞、ランゲルハンス細胞、メラノサイト、脂肪細胞、毛母細胞、毛乳頭細胞など）とを組み合わせて作製された哺乳類（とくにヒト）の皮膚組織等価物を意味する。本発明の人工皮膚は、創傷治癒を促進することを目的として熱傷部位、潰瘍部位、褥瘡部位、採皮部位などの各種皮膚欠損部位に適用される。人工皮膚を構成する各種細胞は、創面において増殖するとともに、創傷治癒に有効な物質（各種細胞の増殖・移動および増殖因子の分泌等を促すことに

よって創傷治癒を促進するサイトカイン、周辺の細胞が移動し組織を再構築する際の足場となる細胞外基質などを合成・分泌する。

本発明の「人工肝臓」とは、基材と哺乳動物由来の肝細胞とを組み合わせで作製された哺乳動物の肝臓組織等価物を意味する。該人工肝臓は、生命に必要な物質の代謝や合成、有害物質の異化作用、中間代謝産物の除去といった肝臓が担う機能の一部を代行する目的で開発されており、末期の急性および慢性の肝不全患者を治療する方法としての臨床応用が期待できる。

人工皮膚の一般的な作製方法としては、まず皮膚由来の細胞を用いて細胞懸濁液を調製した後、基材に該細胞懸濁液を播種することによって得られる。以下に、線維芽細胞から人工皮膚を作製する場合を例示する。

まず清潔な環境下で採取された皮膚（表皮及び真皮の一部または全層を含む）を消毒し、抗生物質を含有する生理的食塩水またはハンクス液などの緩衝液に浸漬する。この皮膚をディスパーゼ濃度を1000IU/mlに調製したDMEMに浸漬した後、真皮と表皮に分離する。得られた真皮をはさみで細かく刻み、ホモジナイザーなどを用いて碎き、0.5%コラーゲナーゼ溶液（0.5%（w/v）コラーゲナーゼ含有DMEM）に浸漬して、37℃にて振とうして結合組織を溶解させる。次いで約200～1000×gで遠心分離して、真皮線維芽細胞を回収する。得られた線維芽細胞はFBS（ウシ胎児血清）を10%（v/v）となるように添加したDMEM（以下、DMEM+10%FBSという）などを培養液として37℃にて培養する。必要に応じて継代培養する。培養した線維芽細胞は0.25%トリプシン溶液（0.

25% (w/v) トリプシンおよび 0.005 mM エチレンジアミン 4 酢酸ナトリウム (EDTA) 含有リン酸緩衝液) を用いて培養フラスコから剥がし、遠心分離して回収する。得られた線維芽細胞の沈殿を DMEM 等で懸濁して線維芽細胞懸濁液を調製する。得られた線維芽細胞懸濁液の細胞濃度をピュルケルーチュルク血球計算板等を用いて測定する。次いで再度遠心分離を行って線維芽細胞を回収し、グリセロール等の凍結保護剤を含む凍結保存液を用いて $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 細胞 / ml、好ましくは $5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 細胞 / ml の密度になるように懸濁液を調製する。ブタあるいはウシ由来アテロコラーゲン溶液をゲル化および凍結乾燥することによって得られる、縦穴空孔を持つコラーゲンスポンジに前記線維芽細胞懸濁液を $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$ 細胞 / cm^2 、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ 細胞 / cm^2 の細胞密度にて播種する。細胞懸濁液がスポンジに浸透するまで静置した後、組織等価物が得られる。

人工肝臓の場合、細胞の単離法としては、肝組織にコラーゲナーゼ溶液を灌流させて細胞を分散させるコラーゲナーゼ灌流法が例としてあげられるが、本発明はこれら単離技術に依存するものではない。また、用いられる培地は、DMEM、チーズ必須培地、修飾イーグル培地、レイボビッツ培地、ウェイマス培地、クレブス培地、グリーン培地、L-15培地などに 10% (v/v) FBS を添加した培地などがあげられ、具体的にはグリーン培地に 10% (v/v) FBS、10 ng / ml ヒト FGF および 13 μg / ml ヘパリンナトリウムを添加した培地が好ましい。

人工角膜の場合、角膜上皮、角膜実質、角膜内皮細胞を組織から単離する方法の例としては、まず、角膜をデ

ィスパーゼ溶液に浸漬して加温・振とうすることにより、角膜内皮細胞を剥離させ、つぎに鉋やカミソリの刃を用いて顕微鏡下で角膜から角膜上皮を剥離し細かく刻むことにより角膜上皮細胞を単離し、得られた角膜内皮および角膜上皮細胞を除去した角膜を、ディッシュ上に置いて培養し、組織から遊走してくる細胞を回収することにより角膜実質細胞を単離する方法(Adclheid I. Schneider et al., In Vitro Cell. Dev. Biol—Animal, Vol. 35. 515—526(1999)およびYoichi Minami et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science, Vol. 34. 2316—2324(1993))が知られているが、本発明はこれら単離技術に依存するものではない。また、用いられる培地は、角膜実質細胞の場合、DMEM、修飾イーグル培地、イーグルの最小必須培地、修飾イーグル培地などに10%(v/v)FBSを添加した培地などがあげられ、DMEM+10%FBSが好ましい。また、角膜上皮細胞の場合はグリーン培地などに10%(v/v)FBSを添加した培地が好ましい。

以下、実施例をあげて本発明を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例1-1：ヒト線維芽細胞由来の人工皮膚の徐冷凍結保存

A 本発明の方法による人工皮膚の凍結保存

培養フラスコ(培養面積80cm²)を用いてヒト線維芽細胞をDMEM+10%FBSで培養した。対数増殖期にある線維芽細胞を0.25%トリプシン溶液で処理し回収した。FBScryo(20%(v/v)FBSおよび10%(v/v)グリセロール含有DMEM)、セルパンガーII(日本全薬工業(株)製)、

セルベーション (Cellvation) (ICNバイオメディカル社製) の 3 種類の凍結保存液にそれぞれ細胞を懸濁し、 9.0×10^5 細胞 / ml の細胞懸濁液を調製した。あらかじめ 12 穴プレートに入れた直径 22mm の円形コラーゲンスポンジに、0.5ml ずつ細胞懸濁液を播種した (1.2×10^5 細胞 / cm^2)。細胞懸濁液がスポンジに浸透するまで静置した後、12 穴プレートを $-0.5 \sim -2^\circ\text{C}$ / 分の速度で冷却して凍結した。

A-1) 人工皮膚の融解および生存率の測定

必要期間 -80°C で保存した後に人工皮膚を 5 % 炭酸ガス、 37°C の条件下で 10 ~ 15 分間静置して融解した。培地を吸引除去した後、2ml の DMEM + 10 % FBS または DMEM で 2 回洗浄した。2ml の DMEM + 10 % FBS または DMEM を添加後、5 % 炭酸ガス、 37°C の条件下で 15 時間以上培養した。次いで、5.0ml の 0.5 % コラゲナーゼ溶液に得られた人工皮膚を浸漬し、 37°C のウォーターバス内で 5 ~ 10 分間振盪して該組織等価物を溶解した。約 $400 \times \text{g}$ 、 4°C の条件下、5 分間の遠心操作により細胞を回収し、生存率を測定した。表 1 に細胞の生存率を示す。いずれの凍結保存液を用いた場合でも、凍結時に急激に生存率が低下し、その後 1 カ月後まではほとんど生存率は変化しない、あるいは徐々に低下することが示された。また、1 カ月後でも 50 % 以上の生存率が得られた。

表 1

凍結保存液	細胞の生存率 (%)				
	0日	1日	1週間	1ヵ月	3ヵ月
F B S cryo	97.2	70.2	62.9	58.2	42.3
セルバンカーII	97.2	—	59.8	67.3	39.5
セルベーション	97.2	—	69.9	59.0	57.1

A-2) 人工皮膚の融解および生物活性の測定

A-2-1: 細胞増殖率

-80℃に保存していた人工皮膚を5%炭酸ガス、37℃の条件下で10~15分間静置して融解した。培地を吸引除去した後、2mlのDMEM+10%FBSまたはDMEMで2回洗浄した。2mlのDMEM+10%FBSまたはDMEMを添加した後、5%炭酸ガス、37℃の条件下で3日間または7日間培養した。次いで、5.0mlの0.5%コラゲナーゼ溶液に得られた人工皮膚を浸漬し、37℃のウォーターバス内で5~10分間振盪して該人工皮膚を溶解した。約400×g、4℃の条件下5分間遠心操作により細胞を回収し、トリパンブルー色素排除法により総細胞数、生細胞数および細胞の生存率を計数した。とくに、DMEM+10%FBSで培養した場合には、培養3日後~7日後にかけて生細胞数が1.4倍にまで増加した。表2に融解後の人工皮膚中の生細胞数を示す。

表 2

	保存方法	細胞	保存培地	培養培地	生細胞数 (個)	
					培養 3 日後	培養 7 日後
本発明	徐冷凍結	浮遊	F B S cryo	DMEM+10%FBS	1.41×10^5	1.94×10^5
	徐冷凍結	浮遊	F B S cryo	DMEM	1.30×10^5	1.42×10^5
比較例	非凍結	接着	DMEM+10%FBS	DMEM+10%FBS	3.07×10^5	2.44×10^5
	非凍結	接着	DMEM	DMEM	2.36×10^5	2.04×10^5

A-2-2: 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 産生能

-80℃ に保存していた人工皮膚を 5 % 炭酸ガス、37℃ の条件下で 10～15 分間静置して融解した。培地を吸引除去した後、2ml の DMEM+10%FBS または DMEM で 2 回洗浄した。各培養液 2ml をそれぞれ添加した後、5 % 炭酸ガス、37℃ の条件下で培養した。培養 3 日後に培養上清を回収して上清中の VEGF 量をエンザイムイムノアッセイ (ELISA) 法により測定した。コントロールとして、凍結を行なわなかった人工皮膚についても同様の測定を行なった。生細胞あたりの VEGF 産生量において、凍結した人工皮膚 (表 3 の ① および ②) と凍結していない人工皮膚 (表 3 の ③ および ④) のあいだで差異はほとんど認められなかった。表 3 に培養 3 日後の人工皮膚の VEGF 産生量 (pg/ml/10⁵ 生細胞) を示す。

表 3

	保存方法	培養培地	VEGF 産生量 (pg/ml/10 ⁵ 生細胞)
本発明	① 徐冷凍結	DMEM+10%FBS	1399
	② 徐冷凍結	DMEM	1474
比較例	③ 非凍結	DMEM+10%FBS	983
	④ 非凍結	DMEM	1137

A-2-3: コラーゲンタイプ I 産生能

−80℃に保存していた人工皮膚を5%炭酸ガス、37℃の条件下で10~15分間静置して融解した。培地を吸引除去した後、2mlのDMEMで2回洗浄した。DMEM 2mlを添加した後、5%炭酸ガス、37℃の条件下で培養した。培養3日後に培養上清を回収して上清中のコラーゲンタイプ I 量をELISA法により測定した。コントロールとして、凍結を行なわなかった人工皮膚についても同様の測定を行なった。本発明者らが用いる抗コラーゲンタイプ I 抗体は培地に含まれる血清中のウシコラーゲンと交差反応してしまうため、DMEMで培養した人工皮膚についてのみ、コラーゲンタイプ I の定量を行なった。培養3日後の生細胞数あたりのコラーゲン産生量は、凍結していない人工皮膚とほぼ同等であった。表4に培養3日後の人工皮膚のコラーゲンタイプ I 産生量 (ng/ml/10⁵生細胞) を示す。

表 4

保存方法	培養培地	コラーゲンタイプ I 産生量 (ng/ml/10 ⁵ 生細胞)
徐冷凍結 (本発明)	DMEM	1883
非凍結 (比較例)	DMEM	1928

B 従来の方法による人工皮膚の凍結保存

培養フラスコ (培養面積80cm²) を用いてヒト線維芽細胞をDMEM+10%FBSで培養した。対数増殖期にある線維芽細胞を0.25%トリプシン溶液で処理し回収した。DMEM+10%FBSで9.0×10⁵細胞/mlの細胞懸濁液を調製した。あらかじめ12穴プレートに入れた直径22mm

の円形コラーゲンスポンジに、0.5mlずつ細胞を播種した (1.2×10^5 細胞 / cm^2)。12穴プレートを、5%炭酸ガス、37℃の条件下で15時間以上培養した。細胞が接着したことを確認したのち、培地を吸引除去後、凍結保存液 (FBS cryo、セルバンガーII、セルベーション) 2mlでそれぞれ2回洗浄した。各ウェルに凍結保存液2mlをそれぞれ添加し、12穴プレートを $-0.5 \sim -2^\circ\text{C} / \text{分}$ の速度で冷却して凍結した。

B-1) 人工皮膚の融解および生存率の測定

必要期間 -80°C で保存した後に人工皮膚を5%炭酸ガス、37℃の条件下で10~15分間静置して融解した。培地を吸引除去した後、2mlのDMEM+10%FBSまたはDMEMで2回洗浄した。2mlのDMEM+10%FBSまたはDMEMを添加後、5%炭酸ガス、37℃の条件下で15時間以上培養した。次いで、得られた人工皮膚を5.0mlの0.5%コラゲナーゼ溶液に浸漬し、37℃のウォータースバス内で5~10分間振盪して人工皮膚を溶解した。約 $400 \times g$ 、4℃の条件下、5分間の遠心操作により細胞を回収した。凍結1日後に人工皮膚を溶解して総細胞数、生細胞数および細胞の生存率を測定した。細胞がコラーゲンスポンジに接着した状態で徐冷凍結すると、凍結保存液の種類に関係なく、細胞の生存率は10~20%と非常に低かった。表5に細胞の生存率を示す。

表 5

凍結保存液	組成または製造元	細胞の生存率 (%)
F B S cryo	F B S 20% (v/v)、 グリセロール10% (v/v)、 D M E M	11
セルバンカーII	日本全薬工業（株）製	15
セルベーション	I C N バイオメディカル社製	15

C 凍結時の細胞形態と細胞の生存率との相関関係

細胞がコラーゲンスポンジに接着した状態で人工皮膚を凍結する従来の方法では、凍結保存液の種類に関係なく、細胞の生存率が非常に低かった。本発明の方法による人工皮膚と、細胞がコラーゲンスポンジに接着した状態で凍結した人工皮膚とのあいだで生存率の相違が認められた原因として、凍結時の細胞形態の違いが考えられた。そこで、人工皮膚凍結時の細胞形態と生存率の関係を明らかにするために、凍結前の培養時間を変化させ、他は実施例1-1のAと同じ手順で人工皮膚を作製し、凍結および融解後の細胞の生存率を測定した。具体的には、細胞懸濁液がスポンジに浸透するまで静置した後（本発明）、あるいは37℃で2時間または15時間培養した後に実施例1-1のAと同じ手順で人工皮膚を作製・凍結した。また、対照として、細胞を播種後37℃で48時間培養した人工皮膚についても同様に細胞の生存率を測定した。細胞を播種後、2時間～15時間培養した人工皮膚では生存率が低かったが、細胞を播種後直ちに凍結した人工皮膚では、非常に高い生存率が得られた。凍結前に顕微鏡観察を行なったところ、播種後2時間培養した人工皮膚では半分以上の細胞が、15時間以上培養した人工皮膚では

すべての細胞がスポンジに接着していることが確認できた。すなわち、細胞の生存率は凍結時の細胞形態によって異なるものと考えられた。細胞が接着していない状態で凍結した人工皮膚の細胞回収率は、凍結していない人工皮膚と比較して90%以上であった。したがって、人工皮膚を融解後に洗浄操作を行なっても細胞はコラーゲンスポンジに滞留していると考えられた。表6に細胞の生存率および総細胞数を示す。

表 6

	凍結保存方法	前培養	細胞の生存率 (%)	総細胞数 (個)
本発明	①徐冷凍結	なし	71.2	2.21×10^5
比較例	②徐冷凍結	2 時間	20.1	2.04×10^5
	③徐冷凍結	1 5 時間	19.8	2.51×10^5
	④非凍結	4 8 時間	90.7	2.31×10^5

実施例 1-2：ヒト線維芽細胞由来の人工皮膚の急速凍結保存

A 本発明の方法による人工皮膚の凍結保存

培養フラスコ（培養面積 80cm^2 ）を用いてヒト線維芽細胞をDMEM+10%FBSで培養した。対数増殖期にある線維芽細胞を0.25%トリプシン溶液で処理し回収した。FBScryoに細胞を懸濁し、 9.0×10^5 細胞/mlの細胞懸濁液を調製した。あらかじめ12穴プレート上に入れた直径22mmの円形コラーゲンスポンジに、0.5mlずつ細胞懸濁液を播種した（ 1.2×10^5 細胞/ cm^2 ）。細胞懸濁液がスポンジに浸透するまで静置したのち、12穴プレートをプラスチックテープでシールした。12穴プレートのまま、 -152°C の超低温冷凍庫に直接入れて凍結し、保存した。

A-1) 人工皮膚の融解および生存率の測定

凍結 1 日後、 -152°C に保存していた人工皮膚を 37°C ウォーターバス中に 3 分間浸漬して融解した。FBScryo 培地を吸引除去したのち、2ml の DMEM + 10% FBS で 2 回洗浄した。2ml の DMEM + 10% FBS を添加後、5% 炭酸ガス、 37°C の条件下で 15 時間以上培養した。次いで得られた人工皮膚を 0.5% コラゲナーゼ溶液 5.0ml に浸漬し、 37°C のウォーターバス内で 5 ~ 10 分間振盪して該人工皮膚を溶解した。約 $400\times g$ 、 4°C の条件下、5 分間、遠心操作により細胞を回収し、トリパンブルー色素排除法により総細胞数、生細胞数および生存率を計測した。コントロールとして凍結していない人工皮膚についても同様に生存率を測定した。 -152°C で急速凍結した人工皮膚において 77.4% と高い生存率が得られた。この結果は徐冷凍結した場合と同等であるといえる。また、本発明の方法により凍結した人工皮膚を融解したのち、一晚培養することによって、細胞が偽足をのぼしてコラーゲンスポンジに接着することを確認した。表 7 に細胞の生存率を示す。

表 7

	前培養	細胞播種時の培地	凍結保存液	凍結温度	細胞の生存率 (%)
凍結 (本発明)	なし	FBScryo	FBScryo	-152°C	77.4
非凍結 (比較例)	48時間	DMEM+10%FBS	非凍結	—	88.7

実施例 2 : 表皮細胞由来の人工皮膚の凍結保存

A 本発明の方法による人工皮膚の作製および凍結方法
培養フラスコ (培養面積 80cm^2) を用いてヒト表皮細胞

胞を3%(v/v)FBS含有グリーン培地(以下、グリーン培地+3%FBSという)で培養した。ヒト表皮細胞を1000unit/mlディスパーゼ(合同酒精(株)製)になるように調製したPBS(-)(リン酸緩衝液)溶液2mlで処理して回収した。回収した表皮細胞をさらに0.25%トリプシン溶液で処理して、単細胞化した。凍結保存液A(10%(v/v)グリセロール、20%(v/v)FBS含有グリーン培地)に懸濁して 2.5×10^6 細胞/mlの細胞懸濁液を調製した。これをあらかじめ12穴プレートに入れた直径22mmの円形コラーゲンスポンジに0.5mlずつ播種した(3.3×10^5 細胞/cm²)。ついで、以下のような方法で人工皮膚を作製した。

①播種後、細胞がスポンジに充分浸透するまで静置したのち、 $-0.2 \sim -5$ ℃/分の速度で -80 ℃まで冷却して凍結した(徐冷凍結法)。

②播種後、細胞がスポンジに充分浸透するまで静置したのち、 -80 ℃の超低温冷凍庫に入れて凍結した(急速凍結法)。

③播種後、細胞がスポンジに充分浸透するまで静置したのち、 -152 ℃の超低温冷凍庫に入れて凍結した(急速凍結法)。

B 従来法による人工皮膚および対照とする人工皮膚の作製法

培養フラスコ(培養面積80cm²)を用いてヒト表皮細胞をグリーン培地+3%FBSで培養した。ヒト表皮細胞を1000unit/mlディスパーゼ(合同酒精(株)製)になるように調製したPBS(-)(リン酸緩衝液)溶液2mlで処理して回収した。回収した表皮細胞をさらに0.25%トリプ

シン溶液で処理して、単細胞化した。グリーン培地 + 3 % FBSに懸濁して 2.5×10^6 細胞 / mlの細胞懸濁液を調製した。これをあらかじめ12穴プレートに入れた直径22mmの円形コラーゲンスポンジに0.5mlずつ播種した (3.3×10^5 細胞 / cm^2)。

ついで、以下のような方法で人工皮膚を作製した。

④播種後一晩（15時間以上）、5 % 炭酸ガス、37℃の条件下で培養した。培地を吸引除去後、凍結保存液Aで2回洗浄した。各ウェルに凍結保存液Aを1.5ml添加し、 $-0.2 \sim -5^\circ\text{C}$ / 分の速度で -80°C まで冷却して凍結した（徐冷凍結法）。

⑤凍結せずに2日間培養し、Cの方法（後述）により細胞の生存率を測定した。

C 人工皮膚の融解および生存率の測定

前記実施例2のA、Bで作製した人工皮膚中の細胞の生存率を以下のような方法で測定した。

1～7日間、 -80°C あるいは -152°C の超低温冷凍庫内で凍結保存していた人工皮膚を37℃ウォーターバスに5～10分間浸漬して融解した。培地を吸引除去後、2.0mlのグリーン培地 + 3 % FBSで2回人工皮膚を洗浄した。同培地を1.5ml添加して5 % 炭酸ガス、37℃の条件下で一晩（15時間以上）培養した。次いで得られた人工皮膚を0.5 % コラゲナーゼ溶液5.0mlに浸漬し、37℃ウォーターバス中で5～10分間振とうしてコラーゲンスポンジを溶解させた。約 $400 \times g$ 、4℃、5分間の遠心操作により細胞を回収した。上清を除去後、0.25 % トリプシン溶液3.0mlを細胞に加えて37℃ウォーターバス中で5～10分間振とうした。再度、約 $400 \times g$ 、4℃、5分間の

遠心操作により細胞を回収した。グリーン培地 + 3 % FBS で細胞を懸濁し、トリパンブルー色素排除法により細胞の生存率を測定した。

その結果、細胞をコラーゲンスポンジに播種したのち、細胞が接着する前に徐冷凍結（本発明、表 8 の①）あるいは急速凍結（本発明、表 8 の②および③）した人工皮膚では高い生存率が得られた。これに対して細胞を播種後、15時間培養したあとで徐冷凍結した人工皮膚（従来法、表 8 の④）では細胞の生存率が低かった。表 8 に細胞の生存率を示す。

表 8

	保存方法	前培養	凍結温度 (℃)	細胞の生存率 (%)
本発明	①徐冷凍結	なし	-80	84.6
	②急速凍結	なし	-80	74.6
	③急速凍結	なし	-152	83.2
比較例	④徐冷凍結	15時間	-80	19.1
	⑤非凍結	48時間	—	89.6

実施例 3：血管内皮細胞由来の人工血管の凍結保存

A 本発明の方法による人工血管の作製および凍結方法
培養フラスコ（培養面積 80cm^2 ）を用いてヒト血管内皮細胞を 10% (v/v) FBS および 10ng/ml ヒト FGF（ヒト線維芽細胞増殖因子）含有グリーン培地で培養した。ヒト血管内皮細胞を 0.25% トリプシン溶液で処理して回収した。凍結保存液 B（10% (v/v) グリセロール、20% (v/v) FBS および 10ng/ml ヒト FGF 含有グリーン培地）に懸濁して 1.4×10^6 細胞 / ml の細胞懸濁液を調製した。これをあらかじめ 12 穴プレートに入れた直径 22mm の円形

コラーゲンスポンジに0.6mlずつ播種した (2.2×10^5 細胞 / cm^2)。

ついで、以下のような方法で人工血管を作製した。

① 播種後、細胞がスポンジに充分浸透するまで静置したのち、 $-0.2 \sim -5^\circ\text{C}$ / 分の速度で -80°C まで冷却して凍結した (徐冷凍結法)。

B 従来法による人工血管および対照とする人工血管の作製法

培養フラスコ (培養面積 80cm^2) を用いてヒト血管内皮細胞を10% (v/v) FBSおよび 10ng/ml ヒトFGF含有グリーン培地で培養した。ヒト血管内皮細胞を0.25%トリプシン溶液で処理して回収した。10% (v/v) FBSおよび 10ng/ml ヒトFGF含有グリーン培地に細胞を懸濁して 1.4×10^6 細胞 / mlの細胞懸濁液を調製した。これをあらかじめ12穴プレートに入れた直径22mmの円形コラーゲンスポンジに0.6mlずつ播種した (2.2×10^5 細胞 / cm^2)。

ついで、以下のような方法で人工血管を作製した。

② 播種後一晩培養し、凍結保存液Bで2回洗浄したのち、 $-0.2 \sim -5^\circ\text{C}$ / 分の速度で -80°C まで冷却して凍結した (徐冷凍結法)。

③ 凍結せずに2日間培養し、Cの方法 (後述) により細胞の生存率を測定した。

C 人工血管の融解および生存率の測定

前記実施例3のA、Bで作製した人工血管中の細胞の生存率を以下のような方法で測定した。

1～7日間、 -80°C の超低温冷凍庫内で凍結保存していた人工血管を 37°C ウォーターバスに5～10分間浸漬して融解した。培地を吸引除去後、2.0mlの10% (v/v) FB

Sおよび10ng/mlヒトFGF含有グリーン培地で2回人工血管を洗浄した。同培地を1.5ml添加して5%炭酸ガス、37℃の条件下で一晩(15時間以上)培養した。次いで得られた人工血管を0.5%コラゲナーゼ溶液5.0mlに浸漬し、37℃ウォーターバス中で5～10分間振とうしてコラーゲンスポンジを溶解させた。約400×g、4℃、5分間の遠心操作により細胞を回収した。上清を除去後、0.25%トリプシン溶液3.0mlを細胞に加えて37℃ウォーターバス中で5～10分間振とうした。再度、約400×g、4℃、5分間の遠心操作により細胞を回収した。10%(v/v)FBSおよび10ng/mlヒトFGF含有グリーン培地で細胞を懸濁し、トリパンブルー色素排除法により細胞の生存率を測定した。

その結果、細胞をコラーゲンスポンジに播種したのち、細胞が接着する前に徐冷凍結した人工血管(本発明、表9の①)では高い生存率が得られた。これと比較して、細胞を播種後、15時間培養したあとで徐冷凍結した人工血管(従来法、表9の②)では細胞の生存率が低かった。表9に細胞の生存率を示す。

表 9

	保存方法	前培養	凍結温度 (℃)	細胞の生存率 (%)
本発明	①徐冷凍結	なし	-80	83.7
比較例	②徐冷凍結	15時間	-80	51.1
	③非凍結	48時間	—	87.7

実施例4：肝細胞由来の人工肝臓の凍結保存

A 本発明の方法による人工肝臓の作製および凍結方法
培養フラスコ(培養面積80cm²)を用いてヒト肝細胞

を10%(v/v)FBS、10ng/mlヒトFGFおよび13 μ g/mlヘパリンナトリウム含有グリーン培地で培養した。ヒト肝細胞を0.25%トリプシン溶液で処理して、回収した。凍結保存液C(10%(v/v)グリセロール、20%(v/v)FBS、10ng/mlヒトFGFおよび13 μ g/mlヘパリンナトリウム含有グリーン培地)に懸濁して1.5 $\times 10^6$ 細胞/mlの細胞懸濁液を調製した。これをあらかじめ12穴プレートに入れた直径22mmの円形コラーゲンスポンジに0.5mlずつ播種した(2.0 $\times 10^5$ 細胞/cm²)。ついで、以下のような方法で人工肝臓を作製した。

①播種後、細胞がスポンジに充分浸透するまで静置したのち、-0.2~-5℃/分の速度で-80℃まで冷却して凍結した(徐冷凍結法)。

②播種後、細胞がスポンジに充分浸透するまで静置したのち、-80℃の超低温冷凍庫に入れて凍結した(急速凍結法)。

③播種後、細胞がスポンジに充分浸透するまで静置したのち、-152℃の超低温冷凍庫に入れて凍結した(急速凍結法)。

B 対照とする人工肝臓の作製法

培養フラスコ(培養面積80cm²)を用いてヒト肝細胞を10%(v/v)FBS、10ng/mlヒトFGFおよび13 μ g/mlヘパリンナトリウム含有グリーン培地で培養した。肝細胞を0.25%トリプシン溶液で処理して、回収した。10%(v/v)FBS、10ng/mlヒトFGFおよび13 μ g/mlヘパリンナトリウム含有グリーン培地に懸濁して1.5 $\times 10^6$ 細胞/mlの細胞懸濁液を調製した。これをあらかじめ12穴プレートに入れた直径22mmの円形コラーゲンスポンジに0.

5mlずつ播種した (2.0×10^5 細胞 / cm^2)。

ついで、以下のような方法で人工肝臓を作製した。

- ④ 播種後一晩 (15時間以上)、5%炭酸ガス、37℃の条件下で培養した。培地を吸引除去後、凍結保存液 C で 2 回洗浄した。各ウェルに凍結保存液 C を 1.5ml 添加し、 $-0.2 \sim -5^\circ\text{C}$ / 分の速度で -80°C まで冷却して凍結した (徐冷凍結法)。
- ⑤ 播種後一晩 (15時間以上)、5%炭酸ガス、37℃の条件下で培養した。培地を吸引除去後、凍結保存液 C で 2 回洗浄した。各ウェルに凍結保存液 C を 1.5ml 添加し、 -80°C の超低温冷蔵庫に入れて凍結した。
- ⑥ 凍結せずに 2 日間培養し、C の方法 (後述) により細胞の生存率を測定した。

C 人工肝臓の融解および生存率の測定

前記実施例 4 の A、B で作製した人工肝臓中の細胞の生存率を以下のような方法で測定した。

1 ~ 7 日間 -80°C あるいは -152°C の超低温冷凍庫内で凍結保存していた人工肝臓を 37°C ウォーターバスに 5 ~ 10 分間浸漬して融解した。培地を吸引除去後、2.0ml の 10% (v/v) FBS、 10ng/ml ヒト FGF および $13\mu\text{g/ml}$ ヘパリンナトリウム含有グリーン培地で 2 回人工肝臓を洗浄した。同培地を 1.5ml 添加して 5%炭酸ガス、37℃の条件下で一晩 (15時間以上) 培養した。次いで得られた人工肝臓を 0.5% コラゲナーゼ溶液 5.0ml に浸漬し、 37°C ウォーターバス中で 5 ~ 10 分間振とうしてコラーゲンスポンジを溶解させた。約 $400 \times g$ 、 4°C 、5 分間の遠心操作により細胞を回収した。10% (v/v) FBS、 10ng/ml ヒト FGF および $13\mu\text{g/ml}$ ヘパリンナトリウム含有グリ

ーン培地で細胞を懸濁し、トリパンブルー色素排除法により細胞の生存率を測定した。

その結果、細胞をコラーゲンスポンジに播種したのち、細胞が接着する前に徐冷凍結（本発明、表10の①）あるいは急速凍結（本発明、表10の②および③）した人工肝臓では高い生存率が得られた。これに対して細胞を播種後、15時間培養したあとで凍結した人工肝臓（従来法、表10の④、⑤）では細胞の生存率が低かった。表10に細胞の生存率を示す。

表 10

	保存方法	前培養	凍結温度 (℃)	細胞の生存率 (%)
本発明	①徐冷凍結	なし	-80	88.5
	②急速凍結	なし	-80	78.5
	③急速凍結	なし	-152	79.6
比較例	④徐冷凍結	15時間	-80	23.9
	⑤急速凍結	15時間	-80	22.9
	⑥非凍結	48時間	—	94.0

実施例 5：角膜実質細胞由来の人工角膜の凍結保存

A 本発明の方法による人工角膜の作製および凍結方法
 培養フラスコ（培養面積80cm²）を用いてウサギ角膜実質細胞をDMEM+10%FBSで培養した。ウサギ角膜実質細胞を0.25%トリプシン溶液で処理して、回収した。凍結保存液FBScryoに懸濁して1.0×10⁶細胞/mlの細胞懸濁液を調製した。これをあらかじめ12穴プレートに入れた直径22mmの円形コラーゲンスポンジに0.5mlずつ播種した（1.3×10⁵細胞/cm²）。ついで、以下のような方法で人工角膜を作製した。

① 播種後、細胞がスポンジに充分浸透するまで静置したのち、 $-0.2 \sim -5^{\circ}\text{C}$ / 分の速度で -80°C まで冷却して凍結した（徐冷凍結法）。

② 播種後、細胞がスポンジに充分浸透するまで静置したのち、 -152°C の超低温冷凍庫に入れて凍結した（急速凍結法）。

B 対照とする人工角膜の作製法

培養フラスコ（培養面積 80cm^2 ）を用いてウサギ角膜実質細胞をDMEM+10%FBSで培養した。角膜実質細胞を0.25%トリプシン溶液で処理して、回収した。DMEM+10%FBSに懸濁して 1.0×10^6 細胞 / mlの細胞懸濁液を調製した。これをあらかじめ12穴プレートに入れた直径22mmの円形コラーゲンスポンジに0.5mlずつ播種した（ 1.3×10^5 細胞 / cm^2 ）。

ついで、以下のような方法で人工角膜を作製した。

③ 播種後一晩（15時間以上）、5%炭酸ガス、 37°C の条件下で培養した。培地を吸引除去後、FBScryoで2回洗浄した。各ウェルにFBScryoを1.5ml添加し、 $-0.2 \sim -5^{\circ}\text{C}$ / 分の速度で -80°C まで冷却して凍結した（徐冷凍結法）。

④ 播種後一晩（15時間以上）、5%炭酸ガス、 37°C の条件下で培養した。培地を吸引除去後、FBScryoで2回洗浄した。各ウェルにFBScryoを1.5ml添加し、 -80°C の超低温冷蔵庫に入れて凍結した。

⑤ 凍結せずに2日間培養し、Cの方法（後述）により細胞の生存率を測定した。

C 人工角膜の融解および生存率の測定

前記実施例5のA、Bで作製した人工角膜中の細胞の

生存率を以下のような方法で測定した。

1～7日間、 -80°C あるいは -152°C の超低温冷凍庫内で凍結保存していた人工角膜を 37°C ウォーターバスに5～10分間浸漬して融解した。培地を吸引除去後、2.0 mlの10% (v/v) FBSで2回人工角膜を洗浄した。同培地を1.5 ml添加して5%炭酸ガス、 37°C の条件下で一晩(15時間以上)培養した。次いで得られた人工角膜を0.5%コラゲナーゼ溶液5.0 mlに浸漬し、 37°C ウォーターバス中で5～10分間振とうしてコラーゲンスポンジを溶解させた。約 $400\times g$ 、 4°C 、5分間の遠心操作により細胞を回収した。DMEM+10%FBSで細胞を懸濁し、トリパンブルー色素排除法により細胞の生存率を測定した。

その結果、細胞をコラーゲンスポンジに播種したのち、細胞が接着する前に徐冷凍結(本発明、表11の①)あるいは急速凍結(本発明、表11の②)した人工角膜では高い生存率が得られた。これに対して細胞を播種後、15時間培養したあとで凍結した人工角膜(従来法、表11の③および④)では細胞の生存率が低かった。表11に細胞の生存率を示す。

表 11

	保存方法	前培養	凍結温度 ($^{\circ}\text{C}$)	細胞の生存率 (%)
本発明	①徐冷凍結	なし	-80	63.5
	②急速凍結	なし	-152	72.4
比較例	③徐冷凍結	15 時間	-80	14.9
	④急速凍結	15 時間	-80	9.1
	⑤非凍結	48 時間	—	88.2

産業上の利用可能性

本発明の凍結保存方法は細胞の生存率が従来の方法より高いため、創傷治癒に有効な組織等価物をより長期に保存することができる。また、本方法は凍結前の前培養および洗浄工程を省略でき、融解後の洗浄操作が簡単であるため、従来の方法と比べて簡便かつ安価である。さらに、本方法では簡単なフリーザー（ $-85^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$ ）で組織等価物の凍結保存が可能なので、より多くの医療施設で保存できる。その上、本方法により凍結保存された組織等価物は、毒性もなく安全性が高いので直ちに臨床に使用することができる。

請求の範囲

1. 細胞を凍結保存液中に懸濁する工程、基材上に該細胞を播種する工程、およびかくして得られる組織等価物を細胞が基材に接着する前に凍結させる工程からなる組織等価物の凍結保存方法。
2. 細胞が哺乳動物由来の線維芽細胞、表皮細胞、血管内皮細胞、ランゲルハンス細胞、メラノサイト、脂肪細胞、毛母細胞、毛乳頭細胞、平滑筋細胞、肝細胞、角膜実質細胞、角膜上皮細胞および角膜内皮細胞からなる群より1つ以上選択される請求の範囲第1項記載の方法。
3. 凍結させる工程が徐冷凍結法によって行なわれる請求の範囲第1項記載の方法。
4. 凍結させる工程が急速凍結法によって行なわれる請求の範囲第1項記載の方法。
5. 凍結させる工程がガラス化凍結法によって行なわれる請求の範囲第1項記載の方法。
6. 凍結後の保存温度が -196°C 以上 -20°C 以下である請求の範囲第1項記載の方法。
7. 組織等価物が、人工皮膚、人工血管、人工肝臓または人工角膜である請求の範囲第1項記載の方法。
8. 凍結保存液中に懸濁された細胞を基材上に播種し、それを細胞が基材に接着する前に凍結させて得られる凍結保存された組織等価物。
9. 組織等価物が、人工皮膚、人工血管、人工肝臓または人工角膜からなる請求の範囲第8項記載の組織等価物。

10. 基材と細胞との組み合わせが、アテロコラーゲンからなるスポンジとヒト由来線維芽細胞との組み合わせである請求の範囲第8項記載の組織等価物。
11. アテロコラーゲンからなるスポンジが縦型空孔を有する請求の範囲第10項記載の組織等価物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01619

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01N1/02, A61F2/06, 2/10, 2/14,
A61L27/38, 27/60

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01N1/02, A61F2/06, 2/10, 2/14,
A61L27/38, 27/60

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 91/18505, A1 (BIOSURFACE TECHNOLOGY, INC.), 12 December, 1991 (12.12.91) & AU, 9180601, A & US, 5145770, A & EP, 532670, A1 & JP, 5-507715, A & JP, 9-110601, A	1-11
A	WO, 96/14738, A2 (CASTRO MUNOZLEDO F), 23 May, 1996 (23.05.96) & AU, 9641067, A & EP, 790767, A1 & KR, 97706727, A & JP, 10-509610, A	1-11
A	JP, 6-209767, A (Japan Vilene Company, Ltd.), 02 August, 1994 (02.08.94) (Family: none)	1-11
A	EP, 296475, A1 (ISTITUTO NAZIONALE PER LA RICERCA SUL CANCRO), 28 December, 1988 (28.12.88) & WO, 88/10068, A1 & AU, 8819957, A & JP, 2-500800, A & ES, 2034034, T3 & US, 5298417, A & KR, 9609482, B1	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 April, 2001 (04.04.01)

Date of mailing of the international search report
17 April, 2001 (17.04.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01619

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 9-173362, A (Menicon Co., Ltd.), 08 July, 1997 (08.07.97) (Family: none)	1-11
A	US, 56554135, A (Imedex, Société Anonyme), 05 August, 1997 (05.08.97) & WO, 92/06179, A1 & EP, 502172, A1 & JP, 5-504085, A & ES, 2106086, T3	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ⁷ A01N1/02, A61F2/06, 2/10, 2/14, A61L27/38, 27/60		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)).		
Int. Cl. ⁷ A01N1/02, A61F2/06, 2/10, 2/14, A61L27/38, 27/60		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 91/18505, A1 (BIOSURFACE TECHNOLOGY, INC.), 12. Dec. 1991 (12. 12. 91) & AU, 9180601, A & US, 5145770, A & EP, 532670, A1 & JP, 5-507715, A & JP, 9-110601, A	1-11
A	WO, 96/14738, A2 (CASTRO MUNOZLEDO F), 23. May. 1996 (23. 05. 96) & AU, 9641067, A & EP, 790767, A1 & KR, 97706727, A & JP, 10-509610, A	1-11
A	JP, 6-209767, A (日本バイリーン株式会社), 2. 8月. 1994 (02. 08. 94) (ファミリーなし)	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
04. 04. 01	17.04.01	
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	4 H 8 4 1 3
日本国特許庁 (ISA/J P)	穴 吹 智 子	
郵便番号100-8915		
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	電話番号 03-3581-1101	内線 3443

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP, 296475, A1 (ISTITUTO NAZIONALE PER LA RICERCA SUL CANCRO), 28. Dec. 1988 (28. 12. 88) & WO, 88/10068, A1 & AU, 8819957, A & JP, 2-500800, A & ES, 2034034, T3 & US, 5298417, A & KR, 9609482, B1	1-11
A	JP, 9-173362, A (株式会社メニコン), 8. 7月. 1997 (08. 07. 97) (ファミリーなし)	1-11
A	US, 56554135, A (Imedex, soci·t· anonyme), 5. Aug. 1997 (05. 08. 97) & WO, 92/06179, A1 & EP, 502172, A1 & JP, 5-504085, A & ES, 2106086, T3	1-11